

Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese bei klinisch-chemischen Serumuntersuchungen¹⁾

Von V. LANGE

Aus dem Anthropologischen Institut der Universität Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. P. Kramp)

(Eingegangen am 2. März 1965)

Die vorliegenden Ergebnisse beruhen auf der Analyse von Serumweißbildern, die bei 140 Patienten mit Hilfe der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese gewonnen wurden. In den normalen Pherogrammen lassen sich bis zu 19 Einzelfraktionen unterscheiden, unter denen sich erbliche Serumgruppen befinden. Die Elektrophoresebilder bei malignen Neoplasien sind überwiegend durch verdoppelte oder abnorm kräftige Cörolplasmin-Zonen sowie durch eine erhebliche Verstärkung des Orosomucoids und der Haptoglobin-Banden gekennzeichnet; diese Veränderungen treten in der Mehrzahl der Fälle gemeinsam auf. Daneben kommen gelegentlich abgeschwächte Transferrine und isolierte Verdichtungen einzelner Abschnitte der γ -Globuline vor. Die Pherogramme der untersuchten Lebercirrhosen zeigen z. T. schwache bis fehlende Haptoglobine und Präalbumine bei verstärkten γ -Globulin-Zonen. Bei entzündlichen Prozessen verschiedener Genese finden sich kräftige Haptoglobin- und Orosomucoid-Banden, jedoch seltener als bei malignen Tumoren. In den Serumweißbildern von Kranken mit Psoriasis fallen verbreiterte Cörolplasmin-Zonen auf. Von geringfügigen Modifikationen abgesehen, sind die Erbmerkmale des Haptoglobin- und Transferrin-Systems qualitativ in typischer Weise ausgeprägt. Die Befunde werden durch Photographien von Originalpherogrammen belegt und unter besonderer Berücksichtigung der pathologischen Veränderungen diskutiert.

In this work the high voltage electrophoresis in starch gel is used for studying pathological traits in the serum of 140 persons. Normal humans show up to 19 fractions among them some hereditary serum groups. The investigated malignant neoplasms are characterized by doubled or very strong coeruloplasmins and an enlargement of the haptoglobins and the orosomucoid, presented often in combination. Occasionally there are weakened transferrins and an isolated concentration of single γ -globulin components. The serum patterns of hepatocirrhosis are partly formed by weak or absent haptoglobins and prealbumins combined with strong γ -globulins. Inflammatory processes show enlarged haptoglobin and orosomucoid fractions but not so often as the malign tumors. In serums of patients with psoriasis broad coeruloplasmin zones can be observed. Except of little modifications the electrophoretical behavior of the hereditary haptoglobin and transferrin groups is qualitatively typical. The findings are demonstrated by photographs and discussed under special reference of the pathological variations.

Für die elektrophoretische Trennung der Serumproteine steht dem klinischen Laboratorium seit einigen Jahren neben den gebräuchlichen Verfahren eine weitere Methode zur Verfügung, bei der statt Papier, Agar-Gel oder Stärkeblock ein Träger-Gel aus hydrolysierten *Kartoffelstärke* verwendet wird. Diese von SMITHIES (1) eingeführte Elektrophorese-Technik eignet sich besonders für die Bestimmung erblicher Serumgruppen. Deshalb hat sich sein Verfahren verhältnismäßig rasch in der humangenetischen Praxis durchgesetzt, freilich meist in abgekürzter Form, wobei man sich im Regelfalle nach vorheriger Zugabe von Hämoglobin auf die isolierte Darstellung der Haptoglobin-Serumgruppen mit Hilfe der Peroxydasereaktion beschränkt, wie z. B. bei PROKOP und BUNDSCHUH (2). Schon die Erbmerkmale des Transferrin-Systems, die sich ebenfalls im Stärke-Gel unterscheiden lassen, werden vergleichsweise viel seltener untersucht. Darüber hinaus benutzen nur wenige Autoren das gute Trennvermögen des Stärke-Gel-Trägers für die vollständige Analyse der Serumproteine, wie das Studium der einschlägigen Literatur zeigt. Das mag daran liegen, daß die üblicherweise angewandten Niederspannungsverfahren nur eine geringgradige Auftrennung ermöglichen, sofern man sich nicht der komplizierten vertikalen Methode von SMITHIES (3) bedient, die eine Laufzeit von 18 Stunden

benötigt. Benutzt man dagegen höhere Spannungen, so kann die Leistungsfähigkeit der Stärke-Gel-Technik nach eigener Erfahrung beträchtlich gesteigert werden. Die erfolgreiche Anwendung dieser Methode setzt jedoch eine bestimmte Versuchsanordnung voraus, die bereits von mir eingehend beschrieben worden ist (4, 5).

Die mit der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese gewonnenen Serumweißbilder weisen bis zu 19 scharf getrennte Zonen auf und lassen genetisch bedingte Gruppenunterschiede und andere Proteinvarianten deutlich erkennen. Die Trennschärfe des Verfahrens erlaubt auch für die Bestimmung niedrig konzentrierter Fraktionen das Arbeiten mit nativem Serum. So konnte bei humangenetischen Untersuchungen die Diagnostik der Haptoglobin- und Transferrin-Serumgruppen verbessert und darüber hinaus ein bisher unbekannter Polymorphismus im Bereich der Post- und Präalbumine beschrieben werden (5). Außerdem hat sich die Methode bei der Untersuchung der Serumproteine subhumaner Primaten bewährt (6). Es lag daher nahe, auch Serumproben von *Kranken* in die Untersuchung einzubeziehen, zumal bereits mit dem Niederspannungsverfahren pathologische Proteinvarianten geprüft worden sind, z. B. beim Myelom und Carcinom (7, 8). Mit der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, welche Ergebnisse bei der klinisch-chemischen Anwendung der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese überhaupt zu erwarten sind. Außerdem interessierte die

¹⁾ Die Arbeit bildet einen Teil der Habilitationsschrift des Verfassers, die der Medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt a. M. vorgelegen hat.

Frage, ob pathologische Prozesse phänotypische Änderungen der erblichen Serumgruppen verursachen können.

Methodik

Hydrolyse der Stärke

300 g Amylum solani Erg. B. 6 der Fa. Tolhausen und Klein (Frankfurt a. M.) werden nach Zugabe von 600 ml Aceton und 6 ml Acidum hydrochloricum fumans 75' bei 38,5° im Wasserbad hydrolysiert, nachdem die Stärke und das Aceton getrennt bei gleicher Temperatur 3 Stdn. im Trockenschrank vorgewärmt worden sind. Die Hydrolyse wird durch Zugabe von 150 ml einer 13,6-proz. Natriumacetat-Lösung unterbrochen, die etwa 5 Min. einwirken soll. Anschließend muß die Stärke im Büchner-Trichter mehrfach mit Aqua dest. gewaschen, über Nacht in Aqua dest. suspendiert und am folgenden Tag zunächst mit dem Boratpuffer für die Gelherstellung und nochmals mit Aqua dest. gespült werden. Nach zweimaliger Suspension in Aceton wird die Stärke auf Filterpapier ausgebreitet und bei Zimmertemperatur getrocknet. Es ist zu beachten, daß die Beschaffenheit der gelieferten Stärke naturbedingte Schwankungen aufweisen kann, die sich gegebenenfalls auf den Hydrolysegrad auswirken. Dieser läßt sich am besten nach der Konsistenz des gekochten Stärke-Puffer-Gemisches beurteilen: eine zu dünnflüssige Lösung ist zu stark, ein übermäßig viskoses Gemisch zu schwach hydrolysiert worden. Im ersten Falle sollte die Hydrolysezeit gekürzt, im zweiten verlängert werden, wobei die evtl. erforderlichen Änderungen bis zu ± 5 Min. betragen.

Herstellung des Stärke-Gels

Für die Zubereitung des Gels wird eine 15-proz. Lösung der vorbehandelten Stärke in einem Boratpuffer vom pH 8,7 (0,015 Mol/l H_3BO_3 und 0,006 Mol/l NaOH) im Rundkolben über der offenen Flamme bis zum Sieden erhitzt und nach Absaugen der Luftblasen entweder in Trovidurschalen von 1,5 mm Stärke (315 \times 60 \times 6,5 mm) oder für größere Gelstücke bis zu 12 cm Breite auf 3 mm starke Glasplatten gegossen, die zuvor mit einem Rand aus Plastilin umgeben worden sind. Nach Erkalten des Gels wird der Plastilinrand entfernt. Das Gel kann bereits $\frac{1}{2}$ Std. nach der Herstellung für die Elektrophorese verwendet werden.

Elektrophorese

Nun ist das in der elektrophoretischen Laufrichtung hintere Drittel des Gels mit scharfem Schnitt abzutrennen und zunächst beiseite zu legen. An die Schnittstelle werden die mit 0,02–0,05 ml Serum getränkten Filterpapierblättchen (7–20 mm breit und 6–7 mm hoch) gelegt und mit dem wiedereingesetzten Gelstück fest angepreßt. Als Apparat hat sich der Pherograph nach WIELAND-PFLEIDERER (9) bewährt. Die Bodenplatte der Trennkammern muß auf -6 bis -12° gekühlt sein. Die Gelbahnen werden durch vierfache Lagen von Filterpapier mit den Elektroden-schalen verbunden. Der Brückenpuffer enthält 0,15 Mol/l H_3BO_3 und 0,03 Mol/l NaOH und hat ein pH von 8,4. In der Regel wird zwischen den Elektroden eine Spannung von etwa 1200 V bei 60 mA angelegt. Im Gel sind dann 18 V/cm wirksam. Die durchschnittliche Laufzeit beträgt 4 Stdn.

Auswertung

Nach Beendigung der Elektrophorese ist es erforderlich, die Gelstücke in ihrer Längsrichtung mit einem Mikrotom aufzuschneiden. Die Serumproteine werden 30–60 Sek. mit einer 0,5-proz. Lösung von Amidoschwarz 10 B in einem Gemisch von Methanol, Aqua dest. und konzentrierter Essigsäure (50:50:10) gefärbt. Die Entfärbebänder, die Methanol, Aqua dest. und konzentrierte Essigsäure in dem gleichen Mengenverhältnis enthalten, müssen bei mehrfachem Wechsel etwa 2 Tage einwirken. Die Pherogramme werden unter Vorsatz eines Orangefilters mit einem Dokumentenfilm photographiert; die Belichtungszeit beträgt 3–4 Sek. bei Blende 11. — Ergänzend sei darauf hingewiesen, daß die Serum-eiweißbilder einschließlich der abgebildeten Pherogramme *ohne* Zugabe von Hämoglobin angefertigt worden sind; diese erfolgte zusätzlich nur in Ausnahmefällen.

Ergebnisse

Die Untersuchung erstreckte sich auf 140 Patienten, deren Serumproteine in 552 Einzelanalysen geprüft worden sind. Die Stichprobe umfaßt 64 maligne Neoplasien, 19 Leberleiden, 13 Lungen-, 7 Blut-, 6 Herz- und rheumatische Krankheiten, 3 entzündliche Prozesse verschiedener Lokalisation sowie 28 Hautkrankheiten. Das Verständnis für die pathologischen Befunde wird erleichtert, wenn man zunächst die Stärke-Gel-Pherogramme *gesunder* Personen betrachtet (Abb. 1): Der Pluspol ist am rechten, der Minuspol am linken Bildende zu denken. Am weitesten anodenwärts sind die Präalbumine (PrA) 1 und 2 als gleichmäßig ausgeprägte, schwache Banden zu erkennen; bei dem 2. Präalbumin handelt es sich um das α_1 -Seromucoid, auch Orosomucoid (O) genannt. Nach der Kathode zu folgt die breite und kräftige Zone des Albumins, der sich 5–6 mittelstarke bis schwache Postalbumin-Banden (PA) anschließen, von denen die mehr nach der Anode zu gelegenen Zonen den α_1 -, die langsamer gewanderten Fraktionen den α_2 -Globulinen entstammen dürften. Kathodenwärts folgt die intensiver gezeichnete Bande des kupferbindenden Cöruoplasmins (Cp), das ebenfalls zu den α_2 -Globulinen gehört. Anschließend stellt sich das Transferrin (Tf) als kräftige Zone dar, bei der es sich um ein β_1 -Globulin handelt. Nach der Kathode zu sind als weiterer Bestandteil der α_2 -Globuline 5 zarte Haptoglobin-Banden (Hp) zu sehen; das 1. und 3. Pherogramm zeigt den Hp-Typ 2–1, beim mittleren liegt der Hp-Typ 2–2 vor. Den Haptoglobinen folgt die scharf begrenzte Bande des α_2 -Makroglobulins (α_2M). Der homogene Streifen links vom Start (kathodenwärts) wird von den γ -Globulinen gebildet, von denen ein kleiner Anteil etwas anodisch wandert. Die beiden Fraktionen werden als γ_1 und γ_2 zeichnet.

Die Stärke-Gel-Pherogramme der 64 Pat. mit *malignen Neoplasien* (38 Carcinome, 15 Hämoblastosen, 5 Sarkome und 6 andere Malignome) zeigen in ihrer Mehrzahl *drei* Abweichungen vom normalen Serumweißbild, die häufig gemeinsam auftreten, obwohl die Blutproben in unterschiedlichen Stadien des Verlaufs und der Therapie abgenommen worden sind. Die pathologischen Befunde sind durch verdoppelte oder sehr dichte, breite Cöruoplasmin-Zonen, eine erhebliche Verstärkung des Orosomucoid

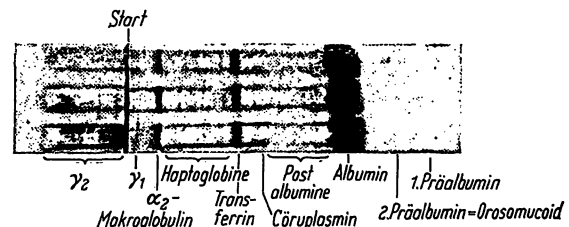


Abb. 1

Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese: Normale Serumweißbilder

Die Originalpherogramme haben im Durchschnitt eine Gesamtlänge von 10 cm

Tab. 1. Pherographische Veränderungen bei malignen Neoplasien.

Absolutzahlen der Patienten mit dem jeweiligen Befund.

Abkürzungen: Cp = Cöroluplasmin; O = Orosomucoid; Hp = Haptoglobin

	n	Cöroluplasmin-Fraktion			Oroso- mucoid verstärkt	Hapto- globine verstärkt	Cp+O+Hp- Befund	Transferrine abgeschwächt	γ-Globulin verstärkt	
		verdoppelt	verstärkt	verbreitert					γ ₁ -	γ ₂ -
Carcinome ¹⁾	38	29	—	6	30	30	24	7	2	12
Hämoblastosen	15	1	9	1	11	7	7	2	3	2
Sarkome	5	2	—	1	4	2	1	—	—	1
Sonstige Malignome	6	4	—	2	6	5	5	—	1	—
		36	9	10					6	15
Gesamt	64	55			51	44	37	9	21	

¹⁾ Darunter 2 Verdachtsdiagnosen.

mucoids und besonders kräftige Haptoglobin-Banden gekennzeichnet. Bei der Trennung der Cöroluplasmin-Fraktion in zwei eng benachbarte, sich teilweise berührende Zonen handelt es sich um einen Befund, der in den Pherogrammen von 1171 gesunden Personen überhaupt nicht (5) und bei den 76 Kranken mit anderen Leiden nur in 2 Fällen beobachtet werden konnte. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ist der Anteil der verdoppelten Cöroluplasminbanden bei den Tumoren größer als bei den Hämoblastosen, die überwiegend durch sehr kräftige Cöroluplasminzonen auffallen. Daneben gibt es Elektrophoresebilder, bei denen die Bande des kupferbindenden Serumproteins lediglich verbreitert ist. Die Pherogramme der Abbildung 2 lassen die beschriebenen zwei Cöroluplasmine deutlich erkennen. Die Abbildung 3 zeigt in beiden Serumbildern eine verbreiterte, Abbildung 4 eine verstärkte Cp-Zone. Die Verdoppelung der Cp-Bande hat je nach dem vorliegenden Haptoglobin-Typ ein etwas unterschiedliches Aussehen. Gehört der Kranke dem Hp-Typ 2—1 an, so ist die schneller wandernde Cp-Zone schwächer gezeichnet als die langsamere, dem Transferrin benachbarte Bande (s. Abb. 2: 1., 3. u. 4. Pherogramm). Handelt es sich um den Hp-Typ 1—1, so stellt sich die schneller wandernde Cöroluplasmin-Zone kräftiger dar, da sie durch die Haptoglobinfraction des Hp-Typs 1—1 verstärkt wird (s. Abb. 2: 2. Pherogramm). Beim

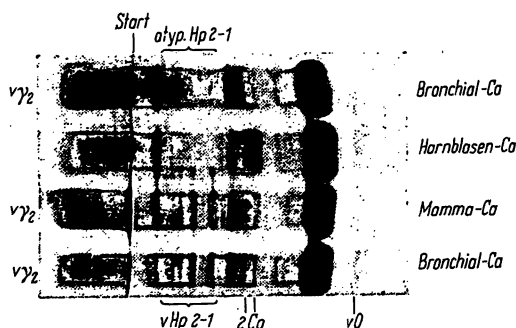


Abb. 2

Verdoppelte Cöroluplasmin-Banden (2 Cp) sowie verstärkte Orosomucoid-(vO) und Haptoglobin-Zonen (vHp) bei Carcinomen. Außerdem verstärkte γ₂-Globuline (vγ₂) und atypischer Hp-Typ 2—1 (oben)

Hp-Typ 2—2 ähnelt die Auftrennung der Cöroluplasminbande dem beim Hp-Typ 2—1 erhobenen Befund, kommt aber relativ selten vor; häufiger findet man eine auffallende Verbreiterung dieser Zone (Abb. 3).

Faßt man alle Cöroluplasminveränderungen zusammen, so weisen 55 der untersuchten 64 Serumproben (= 85,9%) pathologische Cp-Befunde auf. Die übrigen 76 Krankheiten, bei denen es sich nicht um maligne Neoplasien handelt, zeigen nur in 14 Fällen eine atypische Cöroluplasmin-Fraktion (= 18,4%), wenn man zu den oben erwähnten 2 Befunden noch verbreiterte Cp-Zonen hinzurechnet. Die statistische Analyse (Tab. 2) mit Hilfe des χ^2 -Verfahrens¹⁾ ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Krankheitsgruppen: $\chi^2 = 63,59$, $P < 0,1\%$. — Was die Verstärkung des Orosomucoids (2. Präalbumin) angeht, so konnte

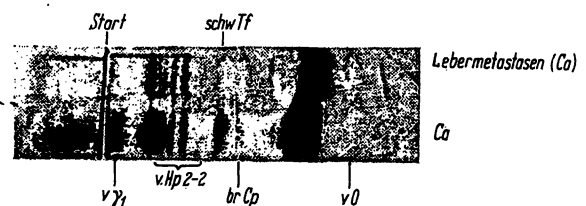


Abb. 3

Verbreiterte Cöroluplasmin-Banden (brCp), verstärkte Orosomucoid-(vO) und Haptoglobin-Zonen (vHp) bei Carcinomen. Außerdem abgeschwächtes Transferrin (schwTf) und isoliert verstärktes γ₁-Globulin (vγ₁)

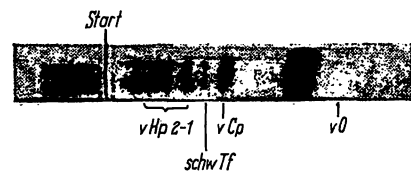


Abb. 4

Verstärkte Cöroluplasmin- (vCp), Orosomucoid- (vO) und Haptoglobin-Zonen (vHp) sowie abgeschwächtes Transferrin (schwTf) bei chron. myeloischer Leukämie

¹⁾ Methodische Hinweise bei HENRYSSON, HASELOFF und HOFFMANN: Kleines Lehrbuch der Statistik. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1960.

Tab. 2. Statistische Analyse der wichtigsten Stärke-Gel-Befunde mit dem χ^2 -Verfahren.
B = Beobachtungswert. E = Erwartungswert. P* bei einem Freiheitsgrad

	n		Cöroluplasmin		Orosomucoid		Haptoglobin	
			+	—	+	—	+	—
Maligne Neoplasien	64	B	55	9	51	13	44	20
		E	31,5	32,5	35,7	28,3	27,4	36,6
Vergleichsgruppe anderer Krankheiten (Keine Malignome)	76	B	14	62	27	49	16	60
		E	37,5	38,5	42,3	33,7	32,6	43,4
Gesamt	140	χ^2 P*	63,59 < 0,1%		27,31 < 0,1%		32,39 < 0,1%	

dieser Befund, der bei Vergleich mit dem ersten Präalbumin sofort ins Auge fällt (s. Abb. 2, 3, 4 und 6), bei 51 (= 79,7%) der untersuchten Patienten erhoben werden. Die einzelnen Formen bösartiger Neubildungen sind ziemlich gleichmäßig von dieser Veränderung betroffen (s. Tab. 1). Dagegen weisen nur 27 von 76 Blutproben der Vergleichsgruppe (= 35,5%) ein verstärktes Orosomucoid auf (Tab. 2); auch dieser Unterschied ist mit einem χ^2 von 27,31 ($P < 0,1\%$) statistisch gesichert. Unter 972 Gesunden fanden sich verschiedene ausgeprägte Präalbumine nur bei 71 Personen (= 7,3%); dabei ist im Gegensatz zu den pathologischen Pherogrammen das erste Präalbumin abgeschwächt und das Orosomucoid von normaler Stärke. Wahrscheinlich handelt es sich um eine erbliche Verschiedenheit (5).

Eine Verstärkung der Haptoglobinzonen, die dritte der erwähnten Abweichungen vom normalen Pherogramm, wurde in den Serumeiweißbildern von 44 Kranken (= 68,8%) beobachtet. Die Abbildungen 2 (3. u. 4. Pherogramm), 3 und 4 zeigen besonders kräftige Hp-Banden, wie sie bei Gesunden nicht vorkommen (s. Abb. 1). Wenn auch bei diesen Untersuchungen keine quantitativen Haptoglobinbestimmungen vorgenommen worden sind, so kann man doch durch vergleichende Auswertung einer großen Zahl von Serumeiweißbildern feststellen, ob die Haptoglobinzonen im Rahmen der normalen Variabilität oder überdurchschnittlich verstärkt ausgebildet sind. Kräftige Haptoglobinzonen sind übrigens nicht nur bei malignen Tumoren sondern auch bei anderen Krankheiten anzutreffen; das war bei 16 der untersuchten 76 (= 21,1%) Serumproben der Fall. Auch für diesen pathologischen Befund besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Krankheitsgruppen, wie sich aus dem χ^2 von 32,39 bei einem $P < 0,1\%$ ergibt (s. Tab. 2).

Das gleichzeitige Vorkommen der beschriebenen Cöroluplasmin-, Orosomucoid- und Haptoglobinveränderungen wurde bei 37 der untersuchten 64 malignen Neoplasien (= 57,8%) festgestellt. Wenn auch diesen pherographischen Befunden in Anbetracht der kleinen Stichprobe noch keine spezifische Bedeutung zukommt, so handelt es sich doch zweifellos um eine bemerkenswerte Gruppierung, die bei den 76 anderen pathologischen Prozessen nur in 2 Fällen (= 2,6%) beobachtet

werden konnte. Dieser auffallende Unterschied ist ebenfalls statistisch gesichert; die Differenz der beiden relativen Häufigkeiten liegt mit 55,2% weit über dem als Zufallsergebnis erlaubten Höchstwert ($P_o - P_u$)¹⁾ von 25,8%.

Von den übrigen pathologischen Befunden in den Serumeiweißbildern der neoplastischen Prozesse sei zunächst eine Abschwächung der Transferrin-Zone erwähnt, die bei 7 Carcinomen und 2 Hämoblastosen festgestellt wurde (s. Tab. 1). Beispiele geben die Abbildungen 3 (oben), 4 und 5 (unten) wieder. Weiterhin konnte bei 21 Patienten eine im Durchschnitt mäßige Verstärkung der γ -Globulin-Zonen beobachtet werden (s. Abb. 2: 1., 3. u. 4. Pherogramm), wobei z. T. das anodisch wandernde γ_1 isoliert von der Vermehrung betroffen war (z. B. Abb. 3 unten). Besonders hervorzuheben sind Verstärkungen des γ_1 bei zwei γ -Plasmocytomen (s. Abb. 6 unten) und eine Verdichtung des am weitesten kathodenwärts gelegenen Anteils des γ_2 -Globulins in einem dritten Fall des gleichen Leidens. Das Pherogramm eines Patienten mit M. Waldenström weist eine Heterogenität des γ_2 auf (Abb. 5 oben); bei der unmittelbar links vom Start gelegenen dichten Zone handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Makroglobulin.

Im Gegensatz zu den malignen Neoplasien zeigen 2 der untersuchten 8 Lebercirrhosen (Tab. 3) sehr schwache Haptoglobin-Banden, die in drei weiteren Serumeiweißbildern fehlen (z. B. Abb. 6 oben). Nur in einem Elektrophoresebild ist eine kräftige Hp 1—1-Bande bei

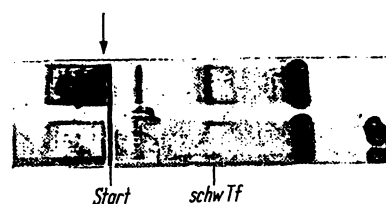


Abb. 5

Heterogene Zone im γ_2 -Globulin (\downarrow) bei M. Waldenström (oben) und abgeschwächtes Transferrin (schwTf) bei Lymphosarkom (unten)

1) Siehe S. KOLLER: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, S. 28—35. Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1953.

Tab. 3. Pherographische Veränderungen bei Leberkrankheiten.
Absolutzahlen der Patienten mit dem jeweiligen Befund

Krankheitsgruppe	n	Haptoglobine		Präalbumine abgeschwächt oder fehlend	Oroso- mucoïd verstärkt	γ -Globulin verstärkt
		abgeschwächt oder fehlend	verstärkt			
Lebercirrhosen	8	5	1	4	1	4
Hepatitis ¹⁾ einschl. 2 Cholecystopathien	11	—	—	—	—	6
	19	5	1	4	1	10

¹⁾ Darunter 1 Hepatose bei Diabetes mellitus.

Tab. 4. Pherographische Veränderungen bei entzündlichen und nichtentzündlichen Prozessen sowie bei Psoriasis vulgaris.
Absolutzahlen der Patienten mit dem jeweiligen Befund

Krankheitsgruppe	n	Cöroluplasmin-Fraktion		Orosomucoïd verstärkt	Haptoglobine verstärkt	Cp+O+Hp- Befund	γ -Globulin verstärkt
		verdoppelt	verbreitert				
Entzündliche Prozesse (z. B. Lungentuberkulose, Bronchitis, Endo- und Myocarditis)	32	2	3	16	11	1	7
Nichtentzündliche Prozesse (z. B. Panmyelophthie, Anämien, M. Osler, Vitium cordis)	14	—	1	7	2	—	4
Psoriasis vulgaris	11	—	8	3	2	1	3
Gesamt	57	2	12	26	15	2	14

14

gleichzeitiger Verstärkung des 2. Präalbumins zu beobachten. Die Präalbumine sind in 3 Fällen erheblich abgeschwächt, so beispielsweise im oberen Pherogramm der Abbildung 6. Bei einem weiteren Patienten lassen sich keine Präalbumine nachweisen. 3 Pherogramme sind durch hochgradig verstärkte γ_2 -Zonen gekennzeichnet (Abb. 6 oben); einmal ist auch die γ_1 -Fraktion sehr kräftig ausgebildet.

Abweichend von den Lebercirrhosen sind die Präalbumine bei den 9 untersuchten *Hepatitis* normal ausgeprägt, und auch die Beschaffenheit der Haptoglobinzonen liegt innerhalb der bei Gesunden beobachteten Variabilität. Hingegen weisen 6 Pherogramme eine Verstärkung der γ -Globuline auf (z. B. Abb. 7 unten). Die dieser Gruppe angefügten 2 Cholecystopathien haben normale Serumeiweißbilder.

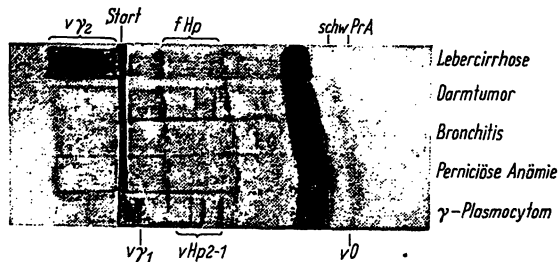


Abb. 6

Fehlende Haptoglobine (fHp), abgeschwächte Präalbumine (schwPrA) und hochgradig verstärktes γ_2 -Globulin ($v\gamma_2$) bei Lebercirrhose (oben). Unten: Isolierte Verdichtung des γ_1 -Globulins sowie verstärkte Orosomucoïd- (vO) und Haptoglobinzonen (vHp) bei γ -Plasmocytom. Die übrigen Pherogramme zum Vergleich

Die Befunde der übrigen Stichproben sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Von den 32 Patienten mit *entzündlichen Prozessen* — ausgenommen sind die schon erwähnten Hepatitis und die gesondert zu besprechenden Fälle von Psoriasis — weisen 16 (= 50%) in ihren Serumbildern ein verstärktes Orosomucoïd auf; 11 Pherogramme (= 34,4%) zeigen überdurchschnittlich kräftige Haptoglobinzonen. Beispiele sind auf den Abbildungen 6 (Mitte) und 8 zu sehen. 5 Elektropho-

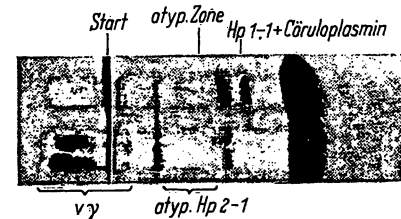


Abb. 7

Atypische Zonen der Haptoglobintypen (Hp) 1—1 (oben) und 2—1 (unten) bei Hepatitis

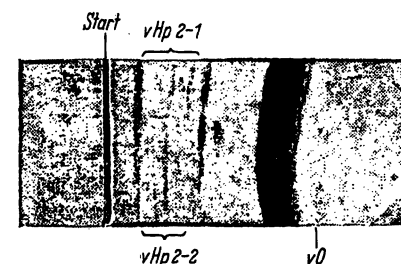


Abb. 8

Verstärkte Orosomucoïd- (vO) und Haptoglobinzonen (vHp) bei Lungentuberkulose

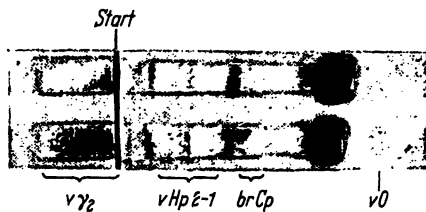


Abb. 9

Verbreiterte und „verwaschene“ Cöroluplasmin-Zonen (brCp) bei Psoriasis

resepilder (= 15,6%) lassen atypische Cp-Fraktionen erkennen, die in 2 Fällen (Emphysebronchitis und Verdacht auf subphrenischen Abszeß) verdoppelt sind. Nur eine Serumprobe zeigt neben den verstärkten Hp-Zonen und dem verdichteten Orosomucoid gleichzeitig auch 2 Cöroluplasmin-Banden. 7 Pherogramme weisen besonders dichte γ -Globulin-Zonen auf; davon ist in 2 Fällen das γ_1 isoliert verstärkt. Bei Entzündungen gehören die beschriebenen Orosomucoid- und Haptoglobinfunde demnach zu den häufigsten Veränderungen, die jedoch seltener als bei malignen Neoplasien auftreten, wie die vergleichende Betrachtung der Tabellen 1 und 4 zeigt. Die Unterschiede liegen für das verstärkte Orosomucoid ($\chi^2 = 8,82$; $P \sim 0,3\%$) an der Grenze der Signifikanz und sind für die kräftigen Haptoglobulin-Banden ($\chi^2 = 10,21$; $P < 0,27\%$) statistisch gesichert. Auch die atypischen Cöroluplasmin-Fraktionen kommen bei Entzündungen signifikant seltener als bei Malignomen vor ($\chi^2 = 45,0$; $P < 0,1\%$).

Die Serumweißbilder bei *Psoriasis* nehmen insofern eine Sonderstellung ein, als in 8 von 11 Pherogrammen verbreiterte, in ihrem kathodischen Anteil verstärkte und auffallend „verwaschen“ gezeichnete Cöroluplasmin-Zonen zu beobachten sind (s. Abb. 9). In einem Falle tritt dieser Befund gemeinsam mit kräftigen Hp-Banden und einem verstärkten Orosomucoid auf (Abb. 9 unten). Abgesehen von diesem Pherogramm finden sich kräftige Hp-Zonen in einem und verstärkte Orosomucoidfraktionen in 2 weiteren Elektrophoresebildern. Bei 3 Serumproben sind die γ -Globuline verstärkt (z. B. Abb. 9 unten).

Die Stärke-Gel-Pherogramme der restlichen Krankheitsbilder sind im wesentlichen *uncharakteristisch*. Hervorgehoben sei allerdings, daß eine Verstärkung des 2. Präalbumins (Orosomucoid) auch bei nichtentzündlichen Leiden vorkommen kann, z. B. bei 2 Panmyelophthisen und einem Vitium cordis.

Die meisten Elektrophoresebilder der erblichen Haptoglobulin-Serumgruppen sind durch die pathologischen Prozesse der vorliegenden Stichprobe nicht verändert worden. Sieht man von den drei oben erwähnten Ahaptoglobulinämien bei Lebercirrhosen ab, so könnten nur bei 12 von 140 Patienten geringfügige Modifikationen beobachtet werden, die in 6 Pherogrammen den Hp-Typ 2—1, in 6 anderen Serumbildern den Hp-Typ 1—1 betrafen; in jedem Falle war eine eindeutige Hp-Diagnose möglich. Bei dem modifizierten Hp-Typ 2—1 ist die normalerweise kräftig ausgebildete, erste

Einzelzone in zwei schwächere Banden aufgesplittet, z. B. bei einem Bronchialcarcinom (Abb. 2 oben) und einer Hepatitis (Abb. 7 unten). Allerdings tritt diese Abweichung gelegentlich auch bei Gesunden auf. In den veränderten Serumbildern des Hp-Typs 1—1 ist kathodenwärts vom Transferrin eine zusätzliche Bande zu beobachten, die in diesem Abstand normalerweise nicht vorkommt. Das obere Pherogramm der Abbildung 7 (Hepatitis) zeigt einen derartigen Befund. Die atypische Zone findet sich bei gesunden Personen nur dann, wenn die Blutabnahme schon längere Zeit zurückliegt. — Die einzige seltene Transferrinvariante der vorliegenden Stichprobe, der Tf-Typ B_2C , weist bei einem Bronchial-Carcinom eine normale Anordnung der Banden auf; entsprechendes gilt auch für die Einzelzonen des Tf-Typs CC bei allen anderen Patienten. — Eine Verwechslung des verstärkten Orosomucoids mit den wahrscheinlich genetisch bedingten Präalbumin-Unterschieden bei gesunden Personen dürfte kaum vorkommen. In solchen Fällen ist, wie oben schon erwähnt, das 1. Präalbumin abgeschwächt, während die pathologische Differenz in der Ausprägung der Präalbumine auf einer Verstärkung des Orosomucoids beruht.

Diskussion

Die mit der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese festgestellten Abweichungen vom normalen Serumweißbild betreffen in erster Linie Teilfraktionen der α_1 - und α_2 -Globuline. Dazu gehört vor allem das Cöroluplasmin, ein kupferbindendes α_2 -Globulin, das sich trotz seiner niedrigen Konzentration von etwa 35 mg% (10) in den angefertigten Pherogrammen als scharf gezeichnete Zone darstellt. Sie zeigt nach eigenen Erfahrungen beim Gesunden eine auffallend gleichmäßige qualitative und quantitative Beschaffenheit und läßt auch keine Gruppenunterschiede erkennen, wenn man von der Verstärkung der Cp-Bande durch das Haptoglobin beim Hp-Typ 1—1 absieht. Um so bemerkenswerter sind die zwei Cöroluplasmin-Zonen in der Mehrzahl der untersuchten malignen Neoplasien. In diesem Zusammenhang dürften die Untersuchungen von RICHTERICH und Mitarbeitern (11) von Bedeutung sein, die nach mehrstufiger säulenchromatographischer Vorfraktionierung zwei als C-C und C-D bezeichnete Cöroluplasmine nachweisen konnten. Normalerweise überwiegt die C-C Fraktion (Mol.-Gew. = 148 000), die im gesunden Zustand etwa 70% der Gesamtmenge an Cöroluplasmin ausmacht und 8 Atome Kupfer im Molekül bindet. Unter pathologischen Bedingungen soll die C-D-Komponente zunehmen, besonders bei Carcinomen, aber auch bei Herzinfarkten und während der Schwangerschaft. Die C-D-Fraktion hat ein um 23 000 geringeres Molekulargewicht, bindet nur 6 Atome Kupfer pro Molekül und ist weniger stabil als das Cöroluplasmin C-C.

Die Ergebnisse von RICHTERICH und Mitarbeitern stützen meine Befunde von 2 Cöroluplasmin-Zonen in den Stärke-Gel-Pherogrammen der Kranken mit mali-

nen Tumoren. Die Erklärung liegt nahe, daß im gesunden Zustand durch das Überwiegen des Cöroluplasmins C-C nur eine Bande sichtbar wird, während sich bei Zunahme der C-D-Fraktion im Stärke-Gel-Pherogramm 2 Zonen herausbilden, zumal die heterogenen Cöroluplasmine ein unterschiedliches Molekulargewicht haben. Wahrscheinlich entspricht die langsamere Cp-Bande, die bei den Hp-Typen 2—1 und 2—2 zugleich die stärkere ist, der C-C-Fraktion. Die schnellere und schwächere Zone könnte von der C-D-Komponente gebildet werden, sofern es sich nicht um eine ganz andere Cp-Fraktion handelt. Beim Hp-Typ 1—1 liegen die Verhältnisse umgekehrt; hier ist die schnellere Bande kräftiger ausgeprägt, weil sie durch das Haptoglobulinmolekül des Hp 1—1 verstärkt wird. Der vermehrte C-D-Anteil transportiert die Hp 1—1-Bande weiter nach der Anode zu, so daß die C-C-Fraktion als zweite Bande kathodenwärts zurückbleibt.

Die verstärkten Cp-Zonen, die vor allem bei Hämoblastosen vorkommen, lassen sich ebenso wie die verbreiterten Cp-Banden angesichts unserer lückenhaften Kenntnisse über die biologischen Funktionen des kupferbindenden α_2 -Globulins (12) zunächst nur als Ausdruck einer quantitativen Zunahme deuten. Da die Cp-Fraktion durch ihren Kupfergehalt zu einem Enzym mit Oxydasewirkung wird (13), wäre es nicht ausgeschlossen, daß eine Beziehung zwischen dem neoplastischen Prozeß und einer gesteigerten Oxydaseaktivität infolge vermehrt gebildeten Cöroluplasmins bestehen könnte. Schließlich sei auf die erhöhten Serumkupferwerte bei malignen Neoplasien (14) hingewiesen, ein Befund, der den beschriebenen Cp-Veränderungen entsprechen dürfte.

Die hochgradige Verstärkung der Haptoglobinzonen bei malignen Tumoren ist zweifellos eine Folge der bei dieser Krankheitsgruppe häufig festgestellten Vermehrung der α_2 -Globuline (15). JAYLE und Mitarbeiter (16) haben sogar vermutet, daß diese Zunahme in erster Linie die Haptoglobine betrifft, die eine Teilfraktion des α_2 -Globulins bilden. Dabei ist noch völlig unklar, welche Funktion der gesteigerten Haptoglobinsynthese zukommt. Die überdurchschnittlich kräftige Zeichnung der Hp-Banden steht auch in Einklang mit der auf quantitativem Wege festgestellten Haptoglobininvermehrung bei neoplastischen Prozessen (17). Die Hp-Werte können bis auf 600 mg% ansteigen, während sie beim Gesunden zwischen 30 und 190 mg% schwanken (18). — Die erhebliche Verbreiterung und Verdichtung des Orosomucoids bei der gleichen Krankheitsgruppe dürfte auf die Vermehrung dieser auch als α_1 -Seromucoid bezeichneten Fraktion zurückzuführen sein, einer Veränderung, die durch quantitative Bestimmung u. a. bei Prozessen mit Gewebsneubildung festgestellt worden ist (19).

Das gleichzeitige Vorkommen der beschriebenen Cöroluplasmin-, Haptoglobin- und Orosomucoidbefunde konnte, von zwei Ausnahmen abgesehen, nur bei malignen Neoplasien beobachtet werden und ist möglicherweise für diese Krankheitsgruppe charakte-

ristisch. Demgegenüber scheinen alle übrigen Veränderungen weniger kennzeichnend zu sein. Das gilt auch für die Verstärkung der γ -Globulin-Zonen, die in mäßigem Umfang bei einem knappen Drittel der neoplastischen Prozesse vorkommt. Eine Fraktionierung, wie sie von KOJECKY und MATLOCHA (20) beschrieben wurde, konnte nicht festgestellt werden. Ob der isolierten Vermehrung des γ_1 -Globulins eine besondere Bedeutung zukommt, ist noch unklar. Bei den untersuchten γ -Plasmocytomen wird diese Zunahme ebenso wie die abnorme Zone in dem γ_2 -Globulin bei *M. Waldenström* auf pathologische Eiweißkörper zurückzuführen sein. Die gelegentlich beobachtete Abschwächung der Transferrin-Zone steht wahrscheinlich mit der Verminderung des Serumeisenspiegels in Zusammenhang (14).

Eine völlig andere und nicht weniger auffallende Gruppierung zeigen die Abweichungen in den Pherogrammen der Lebercirrhosen, bei denen abgeschwächte bis fehlende Haptoglobin- und Präalbumin-Zonen sowie eine erhebliche Verstärkung der γ -Globuline zu den wichtigsten Befunden gehören. Die γ -Vermehrung wird häufig auch bei der Papierelektrophorese festgestellt (15, 21). Die schwachen und fehlenden Hp-Zonen sind sehr wahrscheinlich eine Folge der gestörten Proteinsynthese (18), die durch die hochgradige Schädigung des Leberparenchyms verursacht wird; gleiches dürfte für die Abschwächung und das Fehlen der Präalbumine gelten. Die genannten Ahaptoglobinemien wurden übrigens auch von anderen Autoren beschrieben (17, 22, 23). Bei den untersuchten Hepatitiden war die Leberfunktion offenbar weniger beeinträchtigt, wie aus den normalen Haptoglobin- und Präalbuminbefunden hervorgeht.

Von den übrigen Krankheitsgruppen verdienen die Verstärkungen der Hp-Zonen und des Orosomucoids bei entzündlichen Prozessen besondere Beachtung. Diese Veränderungen treten im Unterschied zu den malignen Neoplasien seltener auf. Die beobachtete Verstärkung der Hp-Banden bei Entzündungen, wiederum Folge einer α_2 -Vermehrung, stimmt mit den Ergebnissen quantitativer (17, 18) und experimenteller (24) Untersuchungen überein. Auch über die Vermehrung des Orosomucoids bei entzündlichen Prozessen liegen Vergleichsbefunde vor (10, 19). Auffallend ist das relativ seltene Vorkommen von verstärkten γ -Globulin-Zonen. Bei der Beurteilung dieses Befundes ist zu berücksichtigen, daß sich die γ -Fraktion im Gegensatz zu der starken Differenzierung aller übrigen Banden des Stärke-Gel-Pherogramms meist nur als homogener Streifen darstellt; deshalb sind mögliche Veränderungen wahrscheinlich schwerer zu erkennen. — Weiterhin wäre zu klären, wie die unscharf begrenzte Cöroluplasminverbreiterung und -verdichtung, vor allem im kathodenwärts gelegenen Anteil, bei der Mehrzahl der untersuchten Fälle von Psoriasis zustandekommt. Eine Trennung in zwei Zonen, wie sie bei malignen Tumoren zu beobachten ist, besteht nicht. Vorerst kann man die beobachtete Cp-Veränderung

nur mit erhöhten Serumkupferwerten bei Psoriasis in Zusammenhang bringen (25, 26).

Für humangenetische Untersuchungen ist außerdem von Bedeutung, daß sich die erblichen Serumgruppen des Haptoglobin- und Transferrin-Systems auch bei pathologischen Prozessen, von Ausnahmen abgesehen, in typischer Weise darstellen. Dieser Sachverhalt ist ein Beweis für die Umweltstabilität dieser Merkmale und wurde, soweit es die Hp-Typen betrifft, auch von anderen Untersuchern beschrieben (3, 23). Was die geringfügige Modifikation des Hp-Typs 2—1 angeht, so zeigt die veränderte erste Zone gelegentlich auch bei Gesunden eine gewisse Labilität. Bei der atypischen Nachbande des Hp 1—1 könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln, zumal diese Zone normalerweise nur dann auftritt, wenn das geprüfte Serum übermäßig lange aufbewahrt worden ist.

Selbstverständlich ist bei der Beurteilung der Ergebnisse der relativ kleine Umfang der Stichprobe zu berücksichtigen.

Weiterhin mag das Fehlen quantitativer Vergleichsuntersuchungen als Mangel gelten. Andererseits ist es von Vorteil, daß man die beschriebenen Veränderungen der meist niedrig konzentrierten Serumfraktionen, die sich mit der Papierelektrophorese nicht gesondert darstellen, ohne komplizierte Vorbehandlung gleichsam mit einem Blick erfassen kann. Diese Möglichkeit dürfte beispielsweise bei der Diagnose von malignen Neoplasien und Lebercirrhosen eine zusätzliche Hilfe sein. Es wäre deshalb lohnend, die Serumuntersuchungen mit der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese in größerem Umfang fortzusetzen und auf andere Krankheitsgruppen auszudehnen.

Der Verfasser ist den Herren Professor Dr. FREY, Professor Dr. HELLRIEGEL, Professor Dr. HERRMANN, Professor Dr. HEYMANN, Professor Dr. HOFF, Professor Dr. RAUSCH und Professor Dr. SPIELMANN für die freundliche Überlassung der Blutproben zu Dank verpflichtet. — Außerdem dankt der Verfasser der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Förderung seiner Arbeit durch Gewährung von Sachbeihilfen.

Literatur

1. SMITHIES, O., *Biochem. J.* 61, 629 (1955). — 2. PROKOP, O. und G. BUNDSCHUH, Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobin- und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin. Walter de Gruyter & Co., Berlin (1963). — 3. SMITHIES, O., *Biochem. J.* 71, 585 (1959). — 4. LANGE, V., *Biochem. Z.* 333, 503 (1961). — 5. LANGE, V., Die Bedeutung der Stärke-Gel-Hochspannungselektrophorese für Humangenetik und Klinik. Eine Untersuchung der menschlichen Serumproteine unter anthropologischen und klinisch-chemischen Gesichtspunkten. Habilitationsschrift, Frankfurt a. M. (1963). — 6. LANGE, V. und J. SCHMITT, *Folia Primat.* 1, 208 (1963). — 7. POULIK, M. D. und O. SMITHIES, *Biochem. J.* 68, 636 (1958). — 8. OWEN, J. A., C. GOT und H. J. SILBERMAN, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 3, 605 (1958). — 9. WIELAND, TH. und G. PFLEIDERER, *Angew. Chemie* 67, 257 (1955). — 10. HITZIG, W. H., Physikalisch-chemische Eigenschaften einzelner Proteinfractionen und spezifische Bestimmungsmethoden. In: Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963). — 11. RICHTERICH, R., A. TEMPERLI und H. AEBI, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 56, 240 (1962). — 12. LAURELL, C. B., On the biological function of transferrins, coeruloplasmins and haptoglobins. In: *Biochemie und Klinik der menschlichen Bluteiweiße*. Benno Schwabe, Basel-Stuttgart (1961). — 13. HOLMBERG, C. G. und C. B. LAURELL, *Acta. chem. scand.* 5, 476 (1951). — 14. KAUTZSCH, E., *Med. Welt*, 1851 (1959). — 15. WUHRMANN, F. und H. H. MÄRKI, Korrelationen zwischen Leukocyten- und Serumproteinverhalten im Blute und ihre Bedeutung. In: *Biochemie und Klinik der menschlichen Bluteiweiße*. Benno Schwabe, Basel-Stuttgart (1961). — 16. JAYLE, M. F., G. BOUSSIER und J. BADIN, *Bull. Soc. Chim. biol.* 34, 1063 (1952). — 17. JAYLE, M. F. und G. BOUSSIER, *Presse méd.* 62, 1752 (1954). — 18. NYMAN, M., *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 11, Suppl. 39 (1959). — 19. JAYLE, M. F., *Schweiz. med. Wschr.* 86, 1425 (1956). — 20. KOJECKY, Z. und Z. MATLOCHA, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 8, 685 (1963). — 21. RIVA, G., Die klinische Bedeutung des Serumweißbildes. In: *Biochemie und Klinik der menschlichen Bluteiweiße*. Benno Schwabe, Basel-Stuttgart (1961). — 22. GALATIUS-JENSEN, F., *Proc. Sixth Congr. European Soc. Haematol.* Copenhagen, 2, 909 (1957). — 23. GALATIUS-JENSEN, F., *Acta genet.* 8, 232 (1958). — 24. MURRAY, R. K. und G. E. CONNELL, *Nature (London)* 186, 86 (1960). — 25. HERRMANN, F., Persönliche Mitteilung (1962). — 26. GÜDE, Z. ZH. und N. I. TUMASHEVA, *Zbl. Haut-Geschl.krkh. (Ref.)* 115, 33 (1963/64).

Priv.-Doz. Dr. med. V. Lange
Anthropolog. Institut der Universität
6 Frankfurt a. M. 1, Siesmayerstr. 70